论著

文章编号:1000-5404(2008)17-1618-04

染料木黄酮对人乳腺癌细胞株MDA-MB-453、MCF-7、MCF-7/HER2增殖能力的影响

李 明,周 永,糜漫天 (第三军医大学军事预防医学院营养与食品卫生学教研室,重庆市营养与食品安全重点实验室,重庆 400038)

摘 要:目的 探讨染料木黄酮(Genistein)对人乳腺癌细胞株MDA-MB-453(ER^-,HER2-high)、MCF-7/HER2(ER^+,HER2-high)、和MCF-7(ER^+,HER2-low)增殖能力的影响,并观察HER2在染料木黄酮抑制肿瘤增殖中的作用。方法 通过基因转染技术建立HER2/neu高表达的人乳腺癌MCF-7细胞,免疫荧光细胞化学法鉴定;不同浓度的Genistein分别处理3种乳腺癌细胞,MTT法分别检测Genistein对肿瘤细胞增殖能力的影响。结果 Genistein对MDA-MB-453细胞的增殖抑制作用随处理浓度增加而增大,IC_{50}约为100 μmol/L;Genistein对MCF-7/HER2和MCF-7细胞在低浓度表现为增殖促进作用,分别在大于40 μmol/L和10 μmol/L时表现为增殖抑制作用。结论 Genistein可通过ER依赖和非依赖两种途径,在一定浓度范围内抑制肿瘤细胞增殖,且HER2高表达能够降低染料木黄酮对ER^+乳腺癌的增殖抑制作用。

关键词:染料木黄酮;肿瘤;MDA-MB-453;MCF-7;HER2;增殖
中图法分类号:R151.41;R730.23;R737.9 文献标识码:A

Effect of genistein on proliferation of human breast cancer cell lines MDA-MB-453, MCF-7 and MCF-7/HER2

LI Ming, ZHOU Yong, MI Man-tian (Department of Nutrition and Food Hygiene, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing Key Laboratory of Nutrition and Food Safety, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of genistein on the proliferation of breast cancer cell lines, MDA-MB-453(ER^-, HER2-high), MCF-7(ER^+, HER2-low), MCF-7/HER2(ER^+, HER2-high), and observe the role of HER2 in the antiproliferative effect of genistein. Methods Breast cancer cell line MCF-7 highly expressing HER-2/neu was constructed by cell transfection, and the successful transfection was confirmed by immunofluorescence cytochemical technology. After treated by genistein (5, 10, 40, 70, 100, 130, 160, 190, 220 mol/L) for 48 h, the 3 cell lines were examined by MTT assay to evaluate the antiproliferative effect of genistein. Results The inhibitive effect of genistein on MDA-MB-453 was increased along with the increasing concentration of genistein, and the IC_{50} was 100 μmol/L. The proliferation of MCF-7/HER2 and MCF-7 were enhanced upon a low concentration of genistein, but inhibited at a higher concentration (40 μmol/L and 10 μmol/L, respectively). Conclusion Genistein could inhibit the proliferation of all 3 breast cancer cell lines within a certain range of concentration through ER-dependent or ER-independent pathways, and HER2 high-expression could attenuate the antiproliferative effect of genistein on ER positive breast cancer cells.

Key words: genistein; tumor; MDA-MB-453; MCF-7; HER2; proliferation

近年来,膳食与肿瘤关系的研究越来越受到人们关注,特别是对大豆中非营养素成分染料木黄酮(genistein, Gen)抗肿瘤活性的研究已经成为当前研究的热点。长期的流行病学的调查研究显示,亚洲人乳腺癌的发病率显著低于西方发达国家,可能与亚洲人膳食中富含Gen有关[1-3]。大量实验研究也表明,染料木黄酮对乳腺癌的发生、发展有显著抑制作用。由于乳腺癌患者中存在雌激素受体(estrogen receptor, ER)阳性(ER^+)和阴性(ER^-)两种类型,而ER^+的乳腺癌患者又分为HER2低表达(HER2-low)与高表达(HER2-high)两种类型,而HER2在染料木黄酮对ER^+或ER^-乳腺癌的增殖抑制中的作用尚不清楚。本实验选择两种人乳腺癌细胞株MDA-MB-453(ER^-, HER2-high)和MCF-7(ER^+, HER2-low),并通过基因转染技术建立HER2/neu高表达的乳腺癌MCF-7细胞(MCF-7/HER2, ER^+, HER2-high),检测染料木黄

基金项目:重庆市自然科学基金(2006BB5103)
Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (2006BB5103)
作者简介:李 明,男,湖南省宜章县人,硕士研究生,医师,主要从事膳食、营养与肿瘤方面的研究。电话:(023)68752291
通信作者:糜漫天,电话:(023)68752292;E-mail:mimt@vip.sina.com
收稿日期:2008-01-24;修回日期:2008-03-29

酮对不同乳腺癌细胞株体外增殖能力的影响,并观察 HER2 在染料木黄酮抑制肿瘤增殖中的作用。

1　材料与方法

1.1　主要试剂

DMEM/F12 为 HyClone 公司产品;RPMI1640、胰蛋白酶为 Gibco 产品;新生胎牛血清购自天津 TBD 公司;Genistein、MTT、曲拉通(Triton-X 100)为 Sigma 产品;质粒抽提试剂盒购自 Promega 公司;各种限制性内切酶、T_4 DNA 连接酶、购自 TaKaRa 公司;Lipofectamine2000 购自 Invitrogen 公司;鼠抗人 HER2/neu 单克隆抗体购自 Zytmed 公司,山羊抗小鼠 IgG 购自北京中杉公司。

1.2　质粒

含人 HER2/neu 基因的质粒 pCMV/ERBB2 由美国 Anderson 癌症研究中心的 MingTan 教授惠赠;含新霉素抗性基因的质粒 pCIneo 由西南医院消化内科熊政硕士惠赠。

1.3　细胞株及感受态细菌

MCF-7 细胞、MDA-MB-453 均购自中科院上海细胞库。pCMV/ERBB2 质粒扩增、酶切鉴定并测试浓度后与 pCIneo 质粒共转染 MCF-7 乳腺癌细胞,400μg/ml G418 筛选 MCF-7 细胞,建立稳定高表达 HER-2/neu 的乳腺癌细胞(MCF-7/HER-2)。DH5α 感受态细菌由第三军医大学医学检验系临床生化教研室张竹君硕士惠赠。

1.4　方法

1.4.1　细胞培养　　MCF-7 和 MCF-7/HER-2 细胞株均用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,在 37 ℃,5% CO_2,100% 饱和湿度条件下常规传代培养,MCF-7/HER-2 培养基中加入 100 μg/ml G418 筛选细胞;MDA-MB-453 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基,在 37 ℃,5% CO_2,100% 饱和湿度条件下常规传代培养。

1.4.2　质粒转化与扩增　　按分子克隆实验指南(第 3 版)[4] 将 pCIneo 质粒和含人 HER-2/neu 基因的 pCMV/ERBB2 质粒分别转化感受态细菌 DH5α。按照 Promega 质粒抽提试剂盒说明书分别对上述二质粒进行提取、纯化,并测定浓度,-20℃保存备用。

1.4.3　质粒转染　　含人 HER-2/neu 基因的质粒 pCMV/ERBB2 经扩增、酶切鉴定和浓度测定后与 pCIneo 质粒共转染 MCF-7 乳腺癌细胞,按照脂质体转染试剂盒说明书进行,然后在倒置荧光显微镜下初步观察转染是否成功,而后以 400 μg/ml G418 初筛 MCF-7 细胞,对照组细胞完全死亡后,以 100 μg/ml G418 维持筛选,传代并冻存备用,免疫荧光细胞化学法检测转染是否成功。

1.4.4　MTT 实验　　收集 MCF-7、MCF-7/HER-2、MDA-MB-453 细胞后,分别用 DMEM/F12 和 RPMI1640 完全培养液制成细胞数为 $3\times10^4\,ml^{-1}$ 的单细胞悬液,接种于 96 孔板,每孔 100 μl,每组设 4 个平行,并设空白对照和溶剂对照组。加入 5、10、40、70、100、130、160、190、220 μmol/L 不同浓度的染料木黄酮分别处理 48 h 后,每孔加入新鲜配制的 5 mg/ml MTT 溶液 20 μl,继续孵育 4 h,小心吸取孔内上清液,每孔加入 150 μl DMSO,轻轻振摇 10 min,490 nm 处测定吸光度值[D(490)]。

半数抑制浓度 IC_{50} = [对照组 D(490) - 处理组 D(490)]/对照组 D(490) ×100%

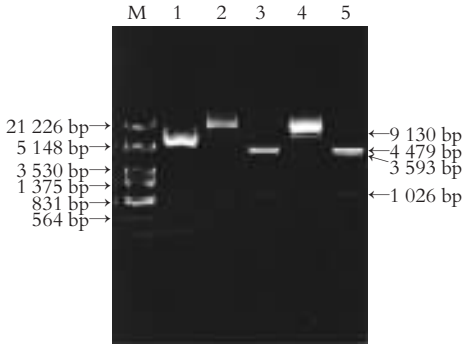
1.5　统计学分析

所有数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件行单因素方差分析。

2　结果

2.1　pCMV/ERBB2 质粒酶切鉴定

pCMV/ERBB2 质粒以 ColE1 为母本质粒,在其中插入 CMV 强启动子和人 erbB-2/neu cDNA 基因构建而成。根据 pCMV/ERBB2 质粒图谱(图 1 所示),该质粒全长 9 130 bp,含有多个限制性内切酶位点,其中包括 2 个 *Hind* Ⅲ和 1 个 *Xho* Ⅰ内切酶的酶切位点,用限制性内切酶 *Xho* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ酶切 pCMV/ERBB2 质粒后,电泳所得 3 个 DNA 片段为 4 479 bp(含 erbB-2/neu 片段)、3 593 bp(含 CMV 启动子)和 1 026 bp,符合理论计算值(图 1)。pCIneo 质粒电泳鉴定图如图 1 所示。



M 标准;1,3:pCMV/ERBB2 质粒酶切片段;2,4:pCMV/ERBB2 质粒;5 pCIneo 质粒

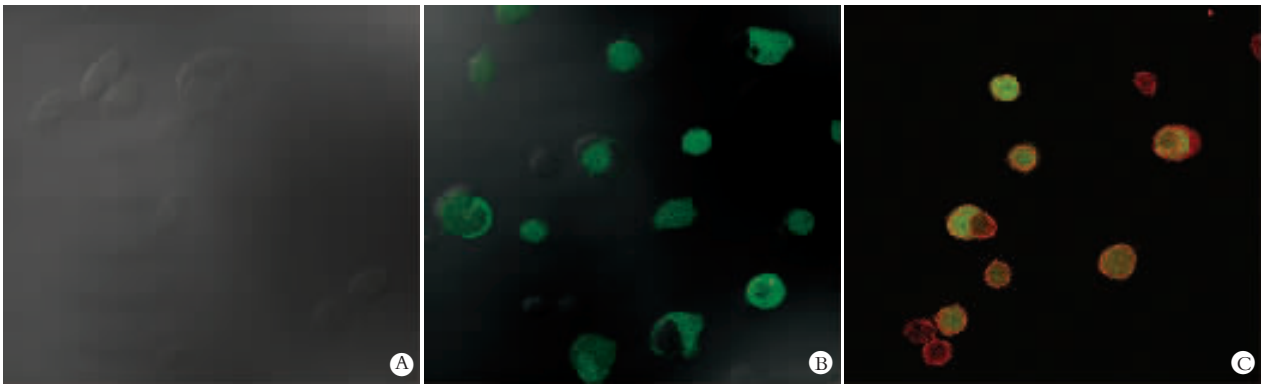
图 1　pCMV/ERBB2 和 pCIneo 质粒鉴定

2.2　免疫荧光细胞化学法鉴定 pCIneo 和 PCMV/ERBB2 共转染的 MCF-7 细胞

PCMV/ERBB2 质粒扩增、酶切鉴并测试浓度后与含新霉素抗性基因的空载体 pCIneo 质粒(带有绿色荧光信号)共转染 MCF-7 乳腺癌细胞,免疫荧光细胞化学法鉴定。如图 2 所示,PCMV/ERBB2 质粒和含新霉素抗性基因质粒共转染的 MCF-7 细胞,在细胞膜和细胞质分别可见红色(粉红色箭头所示)和绿色荧光(白色箭头所示),而只转染含新霉素抗性基因质粒的 MCF-7 细胞于细胞膜和细胞质可见绿色荧光(白色箭头所示),而未转染任何质粒的 MCF-7 细胞则无任何荧光信号。结果表明,PCMV/ERBB2 转染后的 MCF-7 细胞,HER-2/neu 高表达,主要分布于细胞膜和细胞质,单独转染含新霉素抗性基因质粒的 MCF-7 细胞和未转染任何质粒的 MCF-7 细胞 HER-2/neu 不表达,提示我们成功的将 PCMV/ERBB2 质粒和 pCIneo 质粒共转入了 MCF-7 细胞。

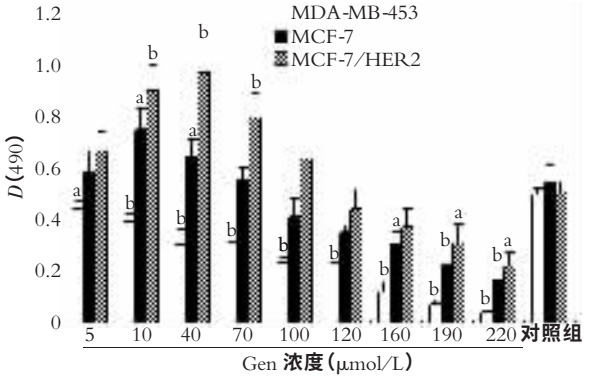
2.3　染料木黄酮对 3 种肿瘤细胞株增殖能力的影响

染料木黄酮对 3 种肿瘤细胞在一定浓度范围内均存在增殖抑制作用。染料木黄酮对 MDA-MB-453 细胞的增殖抑制作用随处理浓度增加而增大[5],IC_{50} 约为 100 μmol/L,对 MCF-7/HER2 和 MCF-7 细胞在低浓度时表现为促增殖作用,分别在大于 40 μmol/L 和 10 μmol/L 时表现为增殖抑制作用[6]。见图 3、4。



A：对照；B：pCIneo 质粒转染 MCF-7 细胞（绿色荧光显示为 pCIneo 蛋白）；C：pCIneo 和 PCMV/ERBB2 质粒共转染 MCF-7 细胞（绿色荧光显示为 pCIneo 蛋白，红色荧光显示为 HER2 蛋白）

图2 免疫荧光细胞化学法鉴定 HER2 转染前后的 MCF-7 细胞 （免疫荧光 ×600）

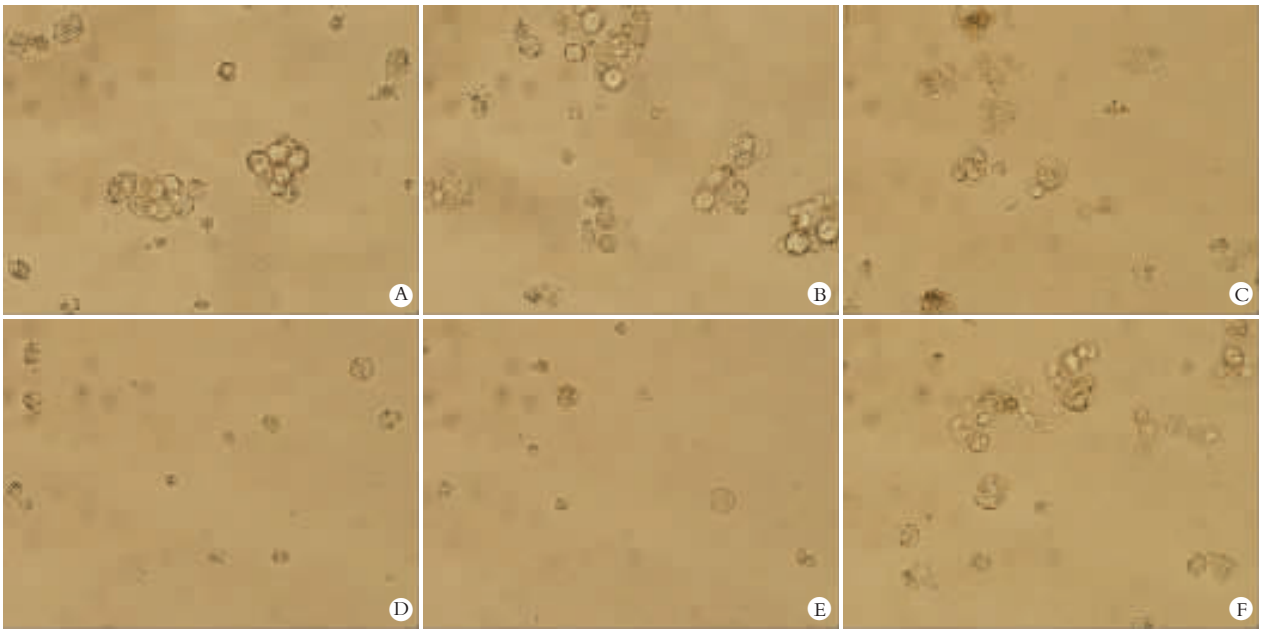


a：$P<0.05$；b：$P<0.01$，与对照组比较

图3 Genistein 对人乳腺癌细胞株 MDA-MB-453、MCF-7、MCF-7/HER2 增殖能力的影响（$n=50$，$\bar{x}\pm s$）

3 讨论

乳腺癌已经成为欧美发达国家成年女性高发的一种恶性肿瘤，仅在美国乳腺癌患者约占所有女性癌症患者的30%[7]。随着近年来生活水平的提高和生活方式的改变，我国乳腺癌发病率也逐年增加。大量的流行病学研究显示，豆类食品的摄入量与乳腺癌的发病率呈显著负相关，这可能与豆类食品中富含的大豆异黄酮类植物化学物密切相关。大豆异黄酮（soybean isoflavones，SIF）是一种天然的植物类雌激素，包括染料木黄酮、黄豆苷元（daidzein，DAI）、黄豆黄素（glycitein）及其糖苷共 12 种，并主要以糖苷形式存在，广泛存在于豆科类植物中，并以大豆含量尤为丰富。由



A：MCF-7/HER2 对照组；B：MCF-7 对照组；C：MDA-MB-453 对照组；D：MCF-7/HER2，100 μmol/L Genistein 处理组；E：MCF-7，100 μmol/L Genistein 处理组；F：MDA-MB-453，60 μmol/L Genistein 处理组

图4 Genistein 处理人乳腺癌细胞株 MDA-MB-453、MCF-7、MCF-7/HER2 形态学变化 （LM ×200）

于其分子结构与内源性雌二醇相似,在体内能够与 ER 结合,故表现出弱的雌激素作用和抗雌激素作用[8]。大量实验研究也表明,染料木黄酮能显著影响肿瘤的发生、发展过程,对多种恶性肿瘤的生长有明显的抑制作用,且其增殖抑制作用主要与其天然雌激素活性及与对 ER 作用有关[9]。然而,大量流行病学研究显示,乳腺癌患者分别存在 ER^- 和 ER^+ 两种类型,同时还存在 HER2 低表达与高表达两种类型,而 HER2 在染料木黄酮对 ER^+ 或 ER^- 乳腺癌的增殖抑制中的作用尚不十分清楚。癌基因 HER-2/neu 表达产物是一种细胞膜上具酪氨酸激酶活性的跨膜蛋白,其结构和功能与表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)相似,主要调节上皮细胞的增殖和分化,HER-2/neu 基因过度表达可导致细胞过度增殖和表型恶性转化。研究表明,有 30% 的乳腺癌患者 HER2 基因过度表达,这类患者肿瘤恶性程度高,复发和转移发生早,预后差,对某些化疗药物存在抵抗,因此,HER2 基因过度表达可能成为判断患者生存期的重要指标。本实验通过基因转染技术构建了 HER-2/neu 高表达的人乳腺癌细胞株 MCF-7/HER2,进而观察染料木黄酮对 MDA-MB-453、MCF-7、MCF-7/HER2 3 种细胞株增殖能力的影响,并观察 HER2 在染料木黄酮抑制肿瘤增殖中的作用。结果表明,染料木黄酮在一定浓度范围内对 3 种肿瘤细胞均有显著抑制作用,但对不同乳腺癌细胞株的增殖抑制作用存在明显差异。染料木黄酮对 ER^+ 的 MCF-7 细胞和 MCF-7/HER2 在低浓度表现为增殖促进,而分别在大于 10 μmol/L 和 40 μmol/L 时表现为增殖抑制作用,表明 HER2 的高表达能明显提高染料木黄酮对肿瘤细胞增殖抑制的作用浓度。染料木黄酮对 ER-的 MDA-MB-453 细胞的增殖抑制作用随处理浓度增大而增强,与其对 ER^+ 的 MCF-7 的增殖抑制作用有显著不同,推测其可能通过 ER 非依赖途径发挥抗肿瘤作用[8]。因此,Genistein 可通过 ER 依赖和非依赖两种途径,在一定浓度范围内抑制肿瘤细胞增殖,且 HER2 能够减弱染料木黄酮对 ER^+ 乳腺癌的增殖抑制作用。

参考文献:

[1] Adlercreutz C H, Goldin B R, Gorbach S L, *et al*. Soybean phytoestrogen intake and cancer risk [J]. J Nutr, 1995, 125(3 Suppl): 757S – 770S.

[2] Constantinou A I, Krygier A E, Mehta R R. Genistein induces maturation of cultured human breast cancer cells and prevents tumor growth in nude mice [J]. Am J Clin Nutr, 1998, 68(6 Suppl): 1426S – 1430S.

[3] Sarkar F H, Li Y. Mechanisms of cancer chemoprevention by soy isoflavone genistein [J]. Cancer Metastasis Rev, 2002, 21(3 – 4): 265 – 280.

[4] Sambrook J, Russell D. 制备和转化感受态大肠杆菌的 Inoue 方法 [M]// Sambrook J, Russell D 著, 黄培堂, 等译. 分子克隆实验指南. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 93 – 95.

[5] 张　红, 朱俊东, 糜漫天, 等. 三羟异黄酮与化疗药物联合作用对人乳腺癌细胞株 MDA-MB-453 增殖的影响[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(7): 710 – 713.

[6] 彭俊华, 糜漫天, 朱俊东. 辛基酚和三羟异黄酮联合作用对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖的影响[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(15): 1578 – 1581.

[7] 赵良才, 汤立建, 李庆林, 等. 植物雌激素干预乳腺癌的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(12): 957 – 960.

[8] 於将林, 李学刚, 李宗澧. 大豆异黄酮的毒性研究进展[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(9): 2526 – 2527.

[9] 河福金, 王　健, 牛建昭, 等. 金雀异黄素对人乳腺癌细胞体外生长的抑制作用[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(12): 936 – 939.

(编辑　王小寒)

(上接 1617 页)

通道,准确地分辨出真道,大大提高手术的成功率。输尿管镜纤细,使操作更为精确,大大避免了新的假道形成。本组病例中,大部分患者均能在输尿管镜引导下直接进镜观察至膀胱,可以在对狭窄段进行全面的观察后再开始进行内切开,大大减少了手术的盲目性。输尿管镜为 $F_{8.0} \sim F_{9.8}$ 渐进性增粗,进镜时也起到了一定的扩张作用,增大了手术操作空间。

尽管此方法有诸多优点,仍须注意以下问题:①因输尿管镜镜头较细,粗暴操作会造成很大损伤,此手术须在技术熟练的情况下轻柔操作。②须在输尿管导管引导下进镜。狭窄后尿道的解剖往往千差万别,在无引导的情况下进镜容易形成新的假道[3]。同时,将输尿管导管置入膀胱可起到引流作用,使手术视野清晰。③在切开狭窄段后,一定要再撤回到狭窄处,对瘢痕组织进行精确切割,尽量使尿道腔宽敞、光滑,这是减少术后狭窄复发的关键[4]。

关键词:输尿管镜 钬激光 尿道狭窄
中图法分类号:R699.6　　文献标识码:B

参考文献:

[1] 金锡御, 吴雄飞, 主编. 尿道外科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 124 – 126.

[2] 庞自力, 肖传国, 曾甫清, 等. 尿道狭窄的内窥镜治疗[J]. 中国内镜杂志, 2003, (1): 7 – 8.

[3] Macdonald M F, Santucci R A. Review and treatment algorithm of surgical techniques for management of urethral strictures [J]. Urology, 2005, 65(1): 9 – 15.

[4] Barbagli G, De Stefani S, Sighinolfi M C, *et al*. Experience with fibrin glue in bulbar urethral reconstruction using dorsal buccal mucosa graft [J]. Urology, 2006, 67(4): 830 – 832.

(编辑　吴培红)